



REC'D 27 MAY 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 AVR. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**

**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)**

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Valérie BITAUD bioMérieux Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE France
Vos références pour ce dossier: PSA ACTIVABLE	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
	Procédé de détection de la forme libre activable du PSA et son utilisation pour le diagnostic des pathologies bénignes de la prostate et de l'adénocarcinome de la prostate
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	BIOMÉRIEUX Chemin de l'Orme 69280 Marcy l'Etoile France France Société anonyme 673 620 399 04.78.87.23.19 04.78.87.21.16 valerie.bitaud@eu.biomerieux.com
5A MANDATAIRE	
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	BITAUD Valérie Liste spéciale, Pouvoir général: 10872 bioMérieux Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE 04.78.87.23.19 04.78.87.21.16 valerie.bitaud@eu.biomerieux.com

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS	Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet	textebrevet.pdf	29	D 25, R 3, AB 1	
Dessins	dessins.pdf	4	page 4, figures 6	
Listage des sequences, PDF	seqpdf.pdf			
Listage des sequences, ASCII	seqtxt.txt			
Désignation d'inventeurs				
Pouvoir général				
7 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement	Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client	3189			
8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	3.00	45.00
Total à acquitter	EURO			365.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, BIOMERIEUX, V.Bitaud

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	3 mars 2004
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique Dépôt en ligne: X Dépôt sur support CD:
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0450426
Vos références pour ce dossier	PSA ACTIVABLE

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	BIOMÉRIEUX
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

Procédé de détection de la forme libre activable du PSA et son utilisation pour le diagnostic des pathologies bénignes de la prostate et de l'adénocarcinome de la prostate

DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	seq1txt.txt
FR-office-specific-info.xml	Comment.PDF	textebrevet.pdf
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	request.xml
seq1pdf.pdf	application-body.xml	

EFFECTUE PAR

Effectué par:	V.Bitaud
Date et heure de réception électronique:	3 mars 2004 11:52:09
Empreinte officielle du dépôt	81:84:6F:97:AF:59:36:31:B4:37:3D:BF:55:5A:51:C5:68:21:4B:79

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersbourg
NATIONAL DE 75000 PARIS cedex 08
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 93 30

La présente invention concerne le diagnostic des adénocarcinomes de la prostate. En particulier, l'invention a pour objet un procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate chez un patient soupçonné d'être atteint de telles pathologies par utilisation de partenaires de liaison capables de reconnaître l'antigène
5 spécifique de la prostate (ou PSA, pour Prostate Specific Antigen) spécifiquement sous sa forme libre activable.

Le PSA est produit par l'épithélium glandulaire de la prostate humaine, probablement sous une forme zymogène inactive (Lundwall *et al.* FEBS Lett. 1987), et est
10 sécrété dans le liquide séminal sous sa forme active (Lilja, J. Clin Invest 1985). L'activité biologique du PSA dans le liquide séminal est liée à sa fragmentation protéolytique limitée des protéines prédominantes sécrétées par les vésicules séminales (Lilja, J. Clin Invest 1985 ; Lilja *et al.* J. Clin Invest 1987 ; Mc Gee *et al.* Biol. reprod. 1988).

Le PSA est le principal marqueur du cancer de la prostate qui affectera, au cours de sa vie, un homme sur six en Occident. Cette protéase de la famille des kallikréines,
15 principalement sécrétée par l'épithélium prostatique, est retrouvée à une concentration de 0,5 à 5 mg/ml dans le liquide séminal et à une concentration un million de fois moindre dans le sérum d'un patient. Ainsi, le PSA est trouvé normalement à une concentration inférieure à 2,5 ng/ml dans le sérum. Cependant, cette concentration augmente en principe notablement lors d'un cancer de la prostate et lors d'altérations bénignes telles que l'hypertrophie de la prostate
20 bénigne (BPH) ou la prostatite aiguë.

La séquence protéique du PSA a été déterminée. Il s'agit d'une glycoprotéine comportant 237 acides aminés ("Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA". Lundwall A., Lilja H., 1987. *FEBS Lett* 214 : 317-322).

Il a été proposé une méthode de diagnostic consistant à mesurer la concentration
25 en PSA sérique et à la comparer à une valeur-seuil qui est de 4 ng/ml. Toutefois, on a constaté que cette méthode de diagnostic conduit à suspecter à tort trois patients sur quatre, ce qui est préjudiciable. De plus, cette méthode ne permet pas de diagnostiquer 30 à 45% des cas de cancers confinés à la glande, ce qui constitue pourtant un stade précoce de la maladie potentiellement curable dont le diagnostic serait donc particulièrement souhaitable. Le caractère

peu satisfaisant de cette méthode est d'ailleurs démontré par l'étude rapportée dans l'article "Prostate Cancer Detection in Men With Serum PSA Concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and Benign Prostate Examination", Catalona *et al.*, JAMA, 14 Mai 1997 – Vol. 277, No. 18, qui montre que la valeur-seuil doit être inférieure à 4 ng/ml pour dépister précocement un cancer de la prostate.

Par ailleurs, il a été montré que dans le sérum, le PSA s'associait à des inhibiteurs de protéase, tels que l' α -1-antichymotrypsine (ACT), et l' α -2 macroglobuline (A2M). Ces associations entraînent l'inactivation de l'activité chymotrypsique du PSA, comme cela a été démontré dans l'article "Enzymatic activity of prostate specific antigen and its reactions with ultracellular serine proteinase inhibitors" A. Christensson, C.B. Laurell, H. Lilja, 1990 Eur. J. Biochem 194 : 755-763. Ceci a également permis de mettre en évidence que le PSA présent dans le sérum était soit sous forme libre, c'est-à-dire non associé, soit sous forme complexée, c'est-à-dire associé. L'usage du ratio PSA libre sur PSA total a alors été proposé afin d'améliorer la spécificité du diagnostic.

Ainsi, la demande de brevet WO97/12245 décrit une méthode permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate sans biopsie. Cette méthode consiste à mesurer, dans le sérum ou dans le sang des patients, la quantité totale de PSA. Si cette valeur est comprise entre 2,5 et 20 ng/ml, on mesure également la concentration de PSA libre. On calcule ensuite le ratio PSA libre sur PSA total. Si ce ratio est inférieur à 7%, le diagnostic s'oriente vers un adénocarcinome de la prostate.

Toutefois, l'utilisation d'un seuil à 7%, pour le diagnostic d'un cancer de la prostate, est controversée par de nombreux auteurs, comme le montre la publication de Lein *et al.* "Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign prostate hyperplasia : which cutoff should be used ?". Dans ce document publié dans la revue Cancer Investigation, 16(1), 45-49, 1998, il a été démontré qu'il est difficile, par le biais de ce ratio, de différencier systématiquement un cancer de la prostate d'une BPH.

Pour ces raisons, la demanderesse s'est intéressée, dans la demande de brevet WO00/02052, à la présence dans le sérum de formes clivées du PSA parmi les formes libres

du PSA. Les formes moléculaires de PSA sérique de patients atteints de cancer ou de BPH ont été cartographiées par électrophorèse bidimensionnelle, associée à une détection par chimioluminescence, afin d'observer l'ensemble des formes de PSA c'est-à-dire les formes libres, dont les formes clivées, et les formes complexées.

5 Les profils d'électrophorèse de sérums de sujets atteints d'adénocarcinome de la prostate sont relativement homogènes, présentant essentiellement les formes libres non clivées du PSA, tandis que ceux de sujets atteints de BPH peuvent comporter une proportion relativement importante de formes libres clivées et des spots légèrement plus basiques sans forme clivée. L'augmentation du ratio PSA libre sérique sur PSA total sérique observée chez les
10 patients atteints de BPH serait donc essentiellement liée à l'existence de PSA libre clivé, qui pourrait être enzymatiquement inactif et donc incapable de se lier à l'ACT, ainsi qu'à la présence d'une forme de PSA libre légèrement plus basique que la forme PSA libre active, qui pourrait correspondre à la forme zymogène, inactive, du PSA.

En fonction de ces observations, la demanderesse a décrit des méthodes de
15 diagnostic d'adénocarcinome de la prostate comprenant la quantification, après séparation par électrophorèse bidimensionnelle, du PSA libre clivé et/ou non clivé et l'utilisation de ces valeurs afin d'établir un diagnostic.

Toutefois, même si ces méthodes ont permis d'améliorer le diagnostic, elles requièrent la mise en œuvre d'électrophorèse bidimensionnelle. Elles sont par conséquent assez
20 coûteuses et nécessitent beaucoup de temps de manipulation.

Pour éviter ces manipulations, il a été décrit dans la demande de brevet WO01/77180 de nouveaux anticorps dirigés spécifiquement contre le PSA libre inactif, clivé et/ou non clivé, ainsi que leur utilisation dans un procédé de diagnostic de pathologie bénigne de la prostate ou de l'adénocarcinome de la prostate.

25 Toutefois, ce procédé a pour inconvénient qu'il ne permet pas de discriminer entre les formes libres clivées et les formes libres non clivées.

Le Demanderesse a maintenant découvert qu'il existait dans les échantillons biologiques de patient, parmi les formes libres du PSA, une nouvelle forme de PSA qui n'est pas la forme zymogène (ProPSA) mais est aussi activable, c'est-à-dire qui a potentiellement la

capacité de réagir avec les inhibiteurs de protéase, et que la détection d'une telle forme libre de PSA activable permettait un diagnostic différentiel entre des sujets atteints de pathologies bénignes de la prostate et des sujets atteints d'adénocarcinome de la prostate avec une excellente spécificité et sensibilité.

5 Ainsi la présente invention a pour objet un procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

 i) mettre en contact un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable avec un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint d'une
10 pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate,

 ii) mettre en évidence la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison,

 iii) calculer le rapport entre la quantité de forme libre activable de PSA détectée dans l'étape ii) et la quantité d'une forme de PSA autre que la forme libre activable, présente dans un
15 échantillon de même nature prélevé chez le même sujet, et

 iv) déterminer si les patients sont affectés par un adénocarcinome de la prostate ou par une pathologie bénigne de la prostate en comparant la valeur du rapport déterminé dans l'étape iii) à une valeur-seuil prédéterminée, choisie selon le type de rapport utilisé et représentative de la limite de détection de chaque pathologie.

20 Les différentes formes du PSA, présentes dans les fluides biologiques tels que le liquide séminal ou le sérum d'un patient, ont souvent eu des dénominations différentes suivant les auteurs. Tous s'accordent à considérer que le PSA total se trouvent sous deux formes que sont la forme libre (PSA libre) et la forme complexée avec des inhibiteurs de protéase tels que l'ACT (PSA complexé). Le PSA libre peut également être dénommé suivant sa taille : lors de
25 sa production sous forme de ProPSA, il possède des acides aminés supplémentaires (7 ou 5 ou 4 ou 2). On parle alors de PSA zymogène ou de ProPSA-7, ProPSA-5, etc. Ce proPSA, après maturation et donc perte de ses acides aminés supplémentaires, peut se retrouver soit sous forme intacte, soit sous forme partielle. Dans ce dernier cas, on parle de PSA tronqué ou clivé. Le PSA libre sous forme intacte peut également être dénaturé (glycosylé ou déglycosylé);

on parle alors de forme dénaturée. Ainsi, les formes de PSA libres comprennent le PSA zymogène, le PSA intact, dénaturé ou non, et le PSA clivé.

On parle aussi, pour ces différentes formes libres ou complexées de PSA, de formes actives et de formes inactives. Par forme active, on entend les formes étant capables de se lier aux inhibiteurs de protéase, tels que l'ACT. Par forme inactive, on entend les formes incapables d'une telle capacité de liaison. On sait que le PSA complexé est inactif puisqu'il s'est déjà lié à un inhibiteur. De même, le PSA libre clivé et le PSA libre dénaturé sont inactifs car ils ne possèdent plus la capacité de se lier aux inhibiteurs. Enfin, les formes du PSA zymogène sont inactives. Les autres formes libres de PSA sont donc actives. Alors que dans le liquide séminal ou dans des surnageants de la lignée cellulaire LnCaP ces formes actives sont présentes, il est couramment admis que ces formes actives n'existent pas dans le sérum car complexées aux inhibiteurs de protéase.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence contre toute attente que parmi ces formes libres actives existait une forme libre activable, c'est-à-dire ayant encore la capacité de se lier aux inhibiteurs de protéase dans le sérum, cette liaison pouvant être mise en œuvre après activation de ladite forme libre activable. Elle a également mis en évidence que l'utilisation du dosage d'une telle forme de PSA libre activable permettait le diagnostic de patients atteints de l'adénocarcinome de la prostate ou d'une BPH.

Sans vouloir être lié à une théorie, la Demanderesse pense que cette forme libre activable de PSA serait, après activation, équivalente à la forme de PSA qui se complexe à l'ACT. Cette forme libre activable serait une forme de PSA « fermée », emprisonnant le site de fixation à l'ACT, son activation permettant de transformer la forme « fermée » en forme « ouverte » et libérer ainsi le site de fixation. La Demanderesse a découvert que, de façon inattendue, les partenaires de liaison reconnaissant l'épitope de séquence SEQ ID N°1 (DTPYPWGWLLDEGYD) étaient capables de se lier spécifiquement dans le sérum à cette forme libre activable de PSA sans se lier ni au PSA libre dénaturé ou clivé, ni au ProPSA, et que l'utilisation de cette propriété particulière permettait d'obtenir un procédé de diagnostic des pathologies liées à la prostate très sensible et très spécifique.

Les échantillons biologiques dans lesquels le procédé de l'invention est mis en

œuvre est tout échantillon biologique susceptible de contenir du PSA. A titre d'exemple de tels échantillons, on peut citer le liquide séminal, le sang, le sérum, le plasma et les urines, le sérum et le plasma étant particulièrement préférés.

Les partenaires de liaison capables de se lier spécifiquement au PSA libre activable
5 appropriés aux fins de l'invention comprennent par exemple les anticorps, les fragments d'anticorps et les mimotopes, ainsi que tout autre partenaire connu de l'homme du métier pour avoir cette capacité.

Par fragments d'anticorps, on entend en général dans la présente demande, tout
fragment d'anticorps ayant conservé la spécificité de l'anticorps d'origine, dans le cas présent la
10 capacité de se lier spécifiquement au PSA libre activable, et en particulier des fragments de type Fab et F(ab')₂. Dans la présente demande, le mot "anticorps" désigne par la suite également des fragments d'anticorps lorsque le sens le permet.

Les anticorps utiles au sens de l'invention comprennent notamment les anticorps
polyclonaux purifiés et les anticorps monoclonaux.

15 La préparation des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux sont largement connus de l'homme du métier et le principe de cette préparation est rappelée ci-après.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec
au moins un antigène cible d'intérêt, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous
20 forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un antigène cible d'intérêt.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes
25 dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des
cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un antigène cible d'intérêt, dont
les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces
lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses

"immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène tumoral d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Par mimotopes, on entend tout peptide synthétique ou recombinant capable de mimer une conformation interagissant spécifiquement avec le dit épitope.

Selon un mode de réalisation préféré, le partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable remplit au moins l'une des conditions suivantes :

- il est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1.
- c'est un anticorps ou un fragment d'anticorps.

La séquence épitopique SEQ ID N°1 reconnue par les partenaires de liaison appropriés aux fins de l'invention mime un épitope conformationnel du PSA.

Un exemple d'anticorps capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1 approprié aux fins de l'invention est l'anticorps 5D3D11 tel que décrit dans Michel S., et al., 1999, Clinical Chemistry, 45(5) : 638-650. L'utilisation de cet anticorps particulier dans le procédé de l'invention est inattendue en ce sens que cet article indique que cet anticorps est capable d'inhiber l'activité enzymatique du PSA et donc la fixation d'ACT, en d'autres termes qu'il n'est capable que de se lier à une forme libre active du PSA «ouverte». Dans le cas présent, la Demanderesse a aussi montré qu'il était capable de se lier à la forme libre activable, c'est-à-dire « fermée ».

Les conjugués constitués du partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable et de la forme libre activable du PSA sont nouveaux et constituent également un objet de l'invention.

Selon un mode de réalisation ledit partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable du conjugué de l'invention est un partenaire de liaison

capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1.

La deuxième étape du procédé de diagnostic de l'invention consiste à mettre en évidence la capture de ladite forme libre activable de PSA par ledit partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable.

5 Cette étape peut être mise en œuvre directement en détectant la liaison entre ledit partenaire de liaison et ladite forme libre activable de PSA, ou bien après élution de ladite forme libre activable de PSA immunocapturée par ledit partenaire de liaison. La forme libre activable du PSA immunocapturée par ledit partenaire de liaison, puis éluée sera appelée dans la suite PSA libre activable immunopurifié.

10 L'élution de la forme libre activable de PSA immunocapturée par ledit partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable peut être mise en œuvre par tout procédé d'élution connu de l'homme du métier, tel qu'un choc de pH. De préférence, on utilise un choc acide, par exemple en utilisant un tampon glycine 0,1M pH 2,8.

15 La détection de la capture de ladite forme libre activable de PSA, qu'elle soit immunopurifiée ou non, peut être réalisée par tout moyen de détection connu dans le domaine des immunodosages, tel que la détection directe et la détection indirecte.

20 Dans le cas de la détection indirecte, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un partenaire de détection, on utilise un partenaire de détection capable de se lier à la forme libre activable du PSA. Ce partenaire de détection se lie sur un épitope différent de celui utilisé par ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) lorsque le PSA libre activable n'est pas immunopurifié. A titre de partenaire de détection approprié à cette fin, on peut citer les anticorps tels que les anticorps anti-PSA total, ce qui constitue un mode de réalisation de l'invention.

25 Des exemples de tels anticorps anti-PSA capables de reconnaître un épitope différent de celui utilisé par ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) sont décrits dans l'article de Michel S., et al (1999, *supra*).

Ces partenaires de détection peuvent être préalablement marqués.

Par marquage, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés luminescents, colorants,
- 5 • les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I ,
- les molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, l'alexa ou les phycocyanines, et
- les particules telles que les particules en or, en latex magnétique, les liposomes.

Des systèmes indirects de marquage peuvent être aussi utilisés, comme par
10 exemple par l'intermédiaire d'un autre couple ligand/anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier, et on peut citer par exemple les couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui est lié au partenaire de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au
15 paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures FR98/10084 ou WO95/08000 de la Demanderesse ou à l'article J. Histochem. Cytochem., (1997), 45 : 481-
20 491.

La détection directe de la capture de la forme libre activable par ledit partenaire de liaison, c'est-à-dire sans l'intermédiaire d'un partenaire de détection, peut être mise en œuvre par exemple par résonance plasmon ou par voltamétrie cyclique sur une électrode portant un polymère conducteur.

25 La détection directe peut également être mise en œuvre en utilisant la propriété particulière d'activité enzymatique des formes actives du PSA. Dans ce cas, il conviendra de procéder à l'activation de la forme libre activable du PSA, le cas échéant après son immunopurification. En effet, l'activation de cette forme libre activable permet de libérer le site de liaison au substrat enzymatique, lequel pourra ensuite être mis à réagir avec un substrat

enzymatique. Ainsi, la détection est mise en œuvre par détermination de l'activité enzymatique de la forme libre du PSA immunopurifiée et activée, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Des exemples de substrats enzymatiques qui conviennent aux fins de l'invention
5 comprennent tous les substrats révélateurs de l'activité protéase de type chymotrypsique largement connus de l'homme du métier. De tels substrats sont disponibles par exemple chez Enzyme System Products. Ils sont composés d'une séquence peptidique reconnue et clivée par le PSA, cette séquence étant couplée à un groupement chromophore ou fluorophore.

L'activation de la forme libre activable du PSA peut être mise en œuvre par au
10 moins l'une des méthodes suivantes :

- mise en contact de ladite forme activable avec un milieu de forte concentration saline, d'au moins 0,15M, de préférence d'au moins 1M, de préférence encore d'au plus 2M,
 - liaison du PSA libre activable immunopurifié à un anticorps capable d'augmenter l'activité enzymatique du PSA,
- 15 ces deux méthodes pouvant être mises en œuvre séparément, simultanément ou successivement, selon n'importe quel ordre.

A titre de milieu de forte concentration saline, on peut citer les milieux contenant du NaCl 1,5M et à titre d'anticorps capable d'augmenter l'activité enzymatique du PSA, on peut citer l'anticorps 8G8F5 (bioMérieux, France).

20 Les conjugués constitués du partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable, tel qu'un partenaire de liaison capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1, et de la forme libre activable du PSA, laquelle est activée, sont également nouveaux et constituent un mode de réalisation particulier de l'invention.

Dans le procédé de l'invention, les partenaires de liaison capables de se lier
25 spécifiquement au PSA libre activable, se liant spécifiquement au PSA libre activable, peuvent être utilisés tels quels ou bien notamment sous forme fixés sur un support solide et/ou liés à un marqueur.

La fixation de ces partenaires de liaison sur un support solide est bien connue. Le support peut être réalisé avec tout matériau solide, biologique ou synthétique, doué de

propriétés adsorbantes ou capables de fixer un agent de couplage. Des matériaux sont connus et décrits dans la littérature. Parmi les matériaux solides capables de fixer ces partenaires de liaison par adsorption, on citera par exemple le polystyrène, le polypropylène, les latex, etc. Parmi les matériaux permettant de fixer ces partenaires de liaison par covalence à l'aide d'un agent de couplage, on peut citer notamment le dextrane, la cellulose, etc. Le support peut se présenter par exemple sous forme de disques, de tubes, de billes ou de plaques, en particulier de plaques de microtitrage.

La liaison des partenaires de liaison à un marqueur permettra également d'obtenir une détection directe, comme décrit précédemment. Ce marqueur est tel que décrit précédemment.

Lorsque le partenaire de liaison n'est pas lié à un support ou lorsque le PSA libre activable est immunopurifié, le procédé de l'invention peut également mettre en œuvre un partenaire de capture. Dans le premier cas, ce partenaire de capture est capable de se lier à un épitope différent de celui reconnu par le partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable.

Des exemples de partenaire de capture comprennent les anticorps anti-PSA tels que décrits précédemment.

Dans la mesure où on utilise dans le procédé de l'invention à la fois un partenaire de capture et à la fois un partenaire de détection pour doser le PSA libre activable, ces partenaires se lient à des épitopes différents, eux-mêmes étant différents de l'épitope reconnu par le partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable lorsque le PSA libre activable n'a pas été immunopurifié.

Les procédés mettant en œuvre les différents partenaires de la forme activable de PSA pour la mise en évidence de la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison sont largement connus de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut citer les méthodes de type sandwich telle que la méthode ELISA, et les méthodes de dosage par compétition.

L'étape iii) du procédé de l'invention consiste à calculer le rapport entre la quantité de forme libre activable de PSA détectée dans l'étape ii) et la quantité d'une forme de PSA

autre que ladite forme activable présente dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet.

Par l'expression "échantillon de même nature prélevé chez le même sujet", on entend soit deux fractions d'un même prélèvement, soit deux échantillons issus de deux
5 prélèvements différents mais qui doivent être de même nature, par exemple des échantillons sériques.

Les formes autres que la forme libre activable du PSA sont notamment le PSA complexé, le PSA total, le PSA libre total, le PSA libre zymogène, le PSA libre dénaturé, le
10 PSA libre clivé et leurs associations, c'est-à-dire l'ensemble des formes actives ou inactives, libres ou complexées, du PSA.

Le dosage de chacune de ces différentes formes notamment à l'aide d'anticorps spécifiques, est connu.

Le PSA complexé est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans la demande de brevet WO98/22509.

15 Le PSA total est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits par H. Nagasaki et al. (1999), Clin. Chem. 45 : 4486-496.

D'autres anticorps capables de se lier à différentes formes du PSA libre, dont le PSA libre total, sont commercialisés par Chugai (Japon), BiosPacific (Emeryville, CA) et
Euromedex US Biological (Swampscott, MA).

20 La quantification est effectuée de façon connue à partir des procédés de mise en évidence de la détection de réactions immunologiques tels que décrits ci-dessus (sandwich, etc.), par exemple en déterminant la quantité de marqueur lorsqu'on utilise le marquage.

Bien entendu, lorsque les quantités mesurées sont destinées à être comparées, il convient que ces valeurs soient comparables. En d'autres termes, il convient que les valeurs
25 mesurées soient rapportées à une même dilution ou concentration éventuelle de l'échantillon ainsi qu'à un même volume.

Les différents rapports qui peuvent être calculés dans l'étape iii) du procédé de l'invention peuvent être choisis parmi les suivants :

- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA total,

- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA libre total,
- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA complexé,
- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA libre clivé,
- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA libre zymogène,
- 5 - quantité de PSA libre activable/quantité de PSA libre dénaturé,
- quantité de PSA libre activable/quantité de (PSA libre dénaturé + PSA libre zymogène),
- quantité de PSA libre activable/quantité de (PSA libre dénaturé + PSA libre clivé),
- quantité de PSA libre activable/quantité de PSA libre inactif (zymogène, dénaturé et clivé)
- les inverses de ces rapports, ou
- 10 - des combinaisons de ces rapports,

les rapports préférés étant relatifs à la quantité de PSA libre activable sur la quantité de (PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) ou la quantité de PSA libre activable sur la quantité de PSA libre inactif.

- Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la forme de PSA autre que
- 15 la forme libre activable utilisée pour calculer le rapport dans l'étape (iii) du procédé de l'invention est la forme de PSA libre dénaturé + la forme de PSA libre clivé ou la forme de PSA libre inactif.

La mise en œuvre de ce calcul se fait bien évidemment comme suit :

- on évalue la quantité de PSA libre activable dans un échantillon biologique prélevé chez un
- 20 sujet, en utilisant le partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable, comme décrit précédemment,
- on évalue l'une des quantités choisies parmi la quantité de PSA total, la quantité de PSA libre total, la quantité de PSA complexé, la quantité de PSA libre zymogène, la quantité de PSA libre clivé, la quantité de PSA libre dénaturé, la quantité de PSA libre dénaturé + PSA libre clivé, la
- 25 quantité de PSA libre dénaturé + PSA libre zymogène et la quantité de PSA libre inactif, ou leurs associations, sur un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet, et
- on détermine ledit rapport ou ledit rapport inverse, ou ladite combinaison de rapports.

L'étape iv) du procédé de l'invention consiste à déterminer si les patients sont affectés par un adénocarcinome de la prostate ou par une pathologie bénigne de la prostate en

comparant la valeur du rapport déterminé dans l'étape iii) à une valeur-seuil prédéterminée, choisie selon le type de rapport utilisé et représentative de la limite de détection de chaque pathologie.

On sait que, de façon générale, les résultats des tests immunologiques dépendent en grande partie des caractéristiques de spécificité et d'affinité des anticorps utilisés, et que ces caractéristiques influent sur les valeurs mesurées avec ces anticorps. On conçoit donc qu'il n'est pas possible de donner des valeurs-seuils précises et que des valeurs-seuils adaptées à chaque anticorps utilisé peuvent être déterminées dans chaque cas par de simples expériences de routine.

Il faut bien comprendre que l'on appelle ici valeur-seuil soit une valeur discrète, soit un intervalle de valeurs correspondant à une zone d'indétermination. Bien évidemment, lorsque la valeur mesurée est incluse dans l'intervalle d'indétermination, ou est très proche de la valeur-seuil dans le cas d'une valeur discrète, on ne peut pas conclure définitivement et il convient de conduire des investigations supplémentaires.

Bien entendu, quand on a déterminé une valeur-seuil pour un type de rapport donné, on peut en déduire des valeurs-seuils correspondant à d'autres types de rapports.

Dans le cas où on considère un rapport PSA libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) ou un rapport PSA libre activable/PSA libre inactif, on diagnostiquera un adénocarcinome de la prostate pour les patients ayant un rapport supérieur à la valeur-seuil obtenue à partir dudit rapport, et on diagnostiquera une BPH ou autre pathologie prostatique non cancéreuse (« patients normaux ») pour les patients ayant un rapport inférieur à cette valeur-seuil.

D'une façon générale, lorsque la quantité de PSA libre activable se trouvera au numérateur du rapport calculé, on diagnostiquera un adénocarcinome de la prostate pour les patients ayant un rapport supérieur à la valeur-seuil obtenue à partir dudit rapport, et on diagnostiquera une BPH ou autre pathologie prostatique non cancéreuse (« patients normaux ») pour les patients ayant un rapport inférieur à cette valeur-seuil. En revanche, lorsque la quantité de PSA libre activable se trouvera au dénominateur du rapport calculé, on diagnostiquera un adénocarcinome de la prostate pour les patients ayant un rapport inférieur à la valeur-seuil

obtenue à partir dudit rapport, et on diagnostiquera une BPH ou autre pathologie prostatique non cancéreuse (« patients normaux ») pour les patients ayant un rapport supérieur à cette valeur-seuil.

Le procédé de l'invention permet le diagnostic des pathologies relatives à la prostate par l'utilisation de la détection de la forme libre activable du PSA.

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation de la forme libre activable du PSA pour le diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate.

Pour mettre en œuvre le procédé de l'invention, l'invention a également pour objet un kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate ou une pathologie bénigne de la prostate, ledit kit comprenant :

- un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable, de préférence un partenaire de liaison capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1, de préférence encore un anticorps ou un fragment d'anticorps, et,
- des moyens pour doser les formes de PSA autres que la forme libre activable, de préférence des anticorps ou fragments d'anticorps.

De tels moyens utilisables dans ledit kit sont tels que décrits précédemment pour le dosage de la forme de PSA que l'on souhaite quantifier.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés uniquement à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 6 annexées, sur lesquelles :

- la figure 1 montre la photographie de 3 gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenue à partir de 0,5 µg de PSA issu du surnageant de culture des cellules LNCaP immunopurifié avec les anticorps 5D3D11 (photographie A), 6C8D8 (photographie B) et 11E5C6 (photographie C),
- la figure 2 représente un graphe de standardisation donnant la fluorescence en fonction de la concentration en PSA obtenu en utilisant du PSA séminal immunopurifié avec l'anticorps 5D3D11 et dosé en PSA total,
- la figure 3 est une représentation graphique donnant les valeurs des rapports PSA

activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) obtenues avec le procédé de l'invention pour des sérum de patients atteints de cancer de la prostate et traités par radiothérapie (RT), par hormonothérapie (HT) ou par prostatectomie (PR), de patients atteints de cancer mais dont on ne connaît pas le traitement (autres), de patients atteints d'hyperplasies bénignes (BPH) et de patients normaux (PN) (partie A du graphe), ainsi que les valeurs des rapports PSA libre/PSA total obtenu selon un procédé de l'art antérieur (partie B du graphe) avec ces mêmes sérums,

5 - la figure 4 est une représentation graphique donnant les valeurs des rapports PSA activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) obtenues avec le procédé de l'invention dans les sérums ayant un rapport PSA libre/PSA total compris entre 0,15 et 0,25, les sérums étant

10 issus de patients atteints de cancer de la prostate et traités par radiothérapie (RT), par hormonothérapie (HT) ou par prostatectomie (PR), de patients atteints de cancer mais dont on ne connaît pas le traitement (autres), de patients atteints d'hyperplasies bénignes (BPH) et de patients normaux (PN),

- la figure 5 est une représentation graphique donnant les valeurs des rapports PSA

15 activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) pour les sérums de patients atteints de cancer de la prostate et de patients atteints d'hyperplasies bénignes (BPH), dont le taux de PSA total est inférieur à 2,5 ng/ml, et

- la figure 6 est une représentation graphique donnant les valeurs des rapports PSA

20 activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) pour les sérums de patients atteints de cancer de la prostate et de patients atteints d'hyperplasies bénignes (BPH), obtenues avec l'anticorps 5D5A5 ou l'anticorps 11E5C6 comme anticorps de détection du PSA activable.

Exemple 1 : Détection de la forme libre activable du PSA à partir de surnageants de LNCaP

1.1 Préparation des surnageants de LNCaP

On a fait synthétiser du PSA par la lignée cellulaire LNCaP selon la technique décrite dans les articles "LNCaP Produces both putative zymogen and inactive, free form of prostate specific antigen" E. Corey et al., 1998, Prostate 35:135-143, "Androgen-Sensitive human prostate cancer cell, LNCaP, Produce both N-terminally mature and tuncated prostate

specific antigen isoform" A. Herrala et al., 1997, Eur. J. Biochem. 255:329-335, "Production of miligram concentration of free prostate specific antigen (fPSA) from LNCaP cell culture : Difference between fPSA from LNCaP cell and seminal plasma." J. T. Wu et al., 1998, J. Clin. Lab. Anal. 12 : 6-13.

5 Le PSA ainsi produit par la lignée cellulaire LNCaP est composé de PSA libre. De plus, comme la culture de la lignée est réalisée en présence de sérum de veau foetal, qui contient de l'ACT, une proportion de complexe PSA-ACT est ainsi également présente.

1.2 Liaison des formes libres du PSA du surnageant par des anticorps de liaison

10 On a utilisé soit l'anticorps 5D3D11, qui est un partenaire de liaison reconnaissant l'épitope de séquence SEQ ID N°1, soit l'anticorps 6D8C8 qui est un partenaire de liaison ne reconnaissant pas cet épitope (Michel S., et al., 1999, *supra*).

On a procédé à la liaison comme suit :

15 Les anticorps 5D3D11 ou 6C8D8 ont été fixés sur un support résine de sepharose activée au CNBr (Pharmacia) selon le protocole classique fourni par le fabricant, bien connu de l'homme de métier. Le rapport de couplage utilisé était 5 mg d'anticorps pour 1 ml de résine gonflée. 1 ml de résine ayant fixé 5 mg d'anticorps a été mis en contact avec 200 ml d'un pool de surnageants cellulaires de LNCaP contenant environ 500 µg de PSA total dosé à l'aide de l'appareil de détection Vidas (kit PSA total, bioMérieux, France). Après 2 passages sur la colonne d'affinité, la fraction contenant le PSA non fixé a été conservée (nommée F1), et le
20 PSA fixé par les anticorps a été élué avec un tampon glycine 0,1 M pH 2,8 neutralisé ensuite à pH 7,2 avec du Tris 2 M pH 8. On a ainsi obtenu les formes libres du PSA immunopurifiées soit par l'anticorps 5D3D11, soit l'anticorps 6C8D8.

1.3 Dosage des formes libres de PSA du surnageant après immunopurification par les anticorps 5D3D11 et 6C8D8

1.3.1. Analyse par électrophorèse bidimensionnelle

25 Le PSA contenu dans les différentes fractions issues de l'immunopurification a été analysé par électrophorèse bidimensionnelle et Western-Blot.

Lors de la séparation selon la première dimension, les protéines migrent en fonction de leur point isoélectrique (pI) par isoélectrofocalisation (IEF) sur un gradient de pH immobilisé

sur des bandelettes de dépôt (Immobiline Dry-strip pH 3-10, 18 cm, non linéaire, Pharmacia) en conditions dénaturantes et réductrices. 0,5 µg de PSA ont été ajoutés à 10 µl d'une solution contenant 10% de SDS et 2,3% de DTT (dithio-1,4-thréitol), et le mélange a été chauffé 5 min à 96°C. Puis l'échantillon a été complété à 500 µl avec la solution de réhydratation (urée 8,3 M, thio-urée 2 M, CHAPS 4% (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane sulfonate), DTT 100 mM, Servalyt 4-9 2%, Orange G 1 mg/ml), et mis en contact avec les bandelettes dans un tube à essai en verre de 20 cm de longueur. L'ensemble a ensuite été recouvert d'huile de paraffine, et incubé toute la nuit. La séparation a été effectuée sous une tension augmentant de façon linéaire de 100 à 3500 V en 8 h, et une étape de focalisation à 6000 V a été réalisée pendant 80 à 100 kVh.

Les protéines ayant focalisé à leur point isoélectrique ont ensuite été séparées dans une deuxième dimension en fonction de leur taille grâce à une électrophorèse SDS-PAGE, sur un grand gel homogène à 12% d'acrylamide à 40 mA par gel, pendant 5-6 h, selon la technique classique d'électrophorèse de protéines.

Les gels obtenus après séparation selon la seconde dimension ont été transférés sur membrane de PVDF (polyvinylidène trifluorure ; Millipore) en tampon CAPS/méthanol (acide 3-[cyclohexilamino]-1-propanesulfonique), pendant 1 nuit sous un courant de 1 A, en maintenant la température à 15°C. Les membranes ont été saturées pendant 1 nuit à 4°C en TBS (Tris Buffer Saline, Tris 15 mM pH 8, NaCl 140 mM) contenant 0,05% de Tween 20 et 5% de lait déshydraté écrémé. L'anticorps anti-PSA 13C9E9, précédemment identifié pour détecter toutes les formes de PSA (Charrier J.P., et al., 2001, Electrophoresis, 22, 1861-1866), a été dilué dans la solution de saturation à 10 µg/ml, et a été ajouté aux membranes. Après une incubation d'1 h à 37°C, les membranes ont été lavées trois fois (5 min) avec une solution de saturation, et mises en contact avec le conjugué anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Etats Unis d'Amérique), dilué au 1/5000^e dans la solution de saturation. Elles ont ensuite été incubées 1 h à température ambiante, lavées trois fois en solution de saturation. L'immunoréactivité a été détectée en utilisant un substrat chemiluminescent (Pierce), en incubant les membranes dans le Fluor S, et en faisant une acquisition de l'image (entre 1 min et 1 h selon l'échantillon). Les images obtenues ont ensuite

été traitées à l'aide du logiciel Multi-Analyst (Biorad).

Les photographies de ces gels sont reproduites sur la figure 1 où la photographie A correspond à l'utilisation de l'anticorps 5D3D11, la photographie B correspond à l'utilisation de l'anticorps 6C8D8 et la photographie C correspond à l'anticorps 11E5C6 (Michel S. et al., 1999, *supra*) qui est un anticorps anti-PSA total utilisé à titre comparatif.

Cette figure montre que, par comparaison au PSA immunopurifié avec l'anticorps anti-PSA total 11E5C6, le PSA immunopurifié par l'anticorps 5D3D11 comporte très peu de formes clivées ou tronquées. En revanche, ces formes sont présentes en proportion beaucoup plus importante dans le PSA immunopurifié avec l'anticorps 6C8D8.

10 1.3.3 Caractérisation des formes zymogènes et mature du PSA immunopurifié par séquençage N-terminal du PSA

5 à 8 µg de PSA cellulaire immunopurifié par les anticorps 5D3D11 ou 6C8D8 ont été soumis à une séparation sur gel SDS-PAGE en conditions réduites et transférés sur membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) selon les techniques bien connues de l'homme du métier. Les bandes de PSA ont été colorées avec une solution de Rouge Ponceau S à 0,25% dans du TCA 3% (acide trichloroacétique), et la bande correspondant au PSA mature (environ 30 kDa) a été découpée et soumise à une dégradation d'Edman sur un séquenceur de protéines Procise 292A (Applied Biosystems).

Les résultats obtenus ont montré que le PSA immunopurifié par l'anticorps 5D3D11 ne contenait que la forme mature (IVGG...), tandis que le PSA immunopurifié par l'anticorps 6C8D8 contenait la forme mature, ainsi que le proPSA(-7) et le proPSA(-5).

1.3.4 Mesure de l'activité enzymatique du PSA cellulaire immunopurifié

Les puits d'une plaque ELISA Nunc Maxisorp noire (compatible avec une détection en fluorescence) ont été coatés 2 heures à 37°C avec 100 µl d'une solution de streptavidine à 10 µg/ml en tampon carbonate pH 9,6 et bloqués pendant 2 heures à 37°C avec du TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0.15 M) contenant 2 mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumine) Après 3 lavages des puits en TBS-Tween 0,05%, 100 µl d'anticorps anti-PSA total biotinylé dilué à 10 µg/ml en TBS-BSA ont été introduits. L'anticorps anti-PSA total peut être soit l'anticorps 11E5C6 qui ne modifie pas l'activité enzymatique du PSA (Michel S. et al.,

1999, *supra*), soit l'anticorps 8G8F5 (bioMérieux, France).

Après 2 heures d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés avec du TBS-Tween 0,05%, et le PSA immunopurifié par les anticorps 5D3D11 ou 6C8D8, dilué en TBS-BSA à 2,5 µg/ml a été introduit et incubé toute la nuit à 4°C. Les puits ont été ensuite lavés à nouveau en TBS-Tween 0,05% et incubés 15 min soit avec le TBS-BSA décrit ci-dessus (contenant 0,15 M de NaCl), soit avec du TBS-BSA dont la concentration en NaCl a été montée à 1,5 M. Les puits ont ensuite été vidés et mis en contact avec 100 µl du substrat fluorescent MuHSSKLQ-AFC (Enzyme System Products, filiale d'ICN) dilué à 300 µM en TBS-BSA contenant soit 0,15 M, soit 1,5 M de NaCl. La cinétique enzymatique a été suivie à 37°C pendant 2 heures (excitation 390 nm, émission 510 nm ; 1 mesure / minute) avec le lecteur Fluoroskan (Thermolabs Systems). L'activité enzymatique du PSA correspond à la pente de la courbe obtenue.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 1 ci-après :

Tableau 1

	Capture par 11E5C6 biotinylé		Capture par 8G8F5 biotinylé	
	NaCl 0,15 M	NaCl 1,5 M	NaCl 0,15 M	NaCl 1,5 M
Surnageant LNCaP	Non détectable	Non détectable	Non détectable	Non détectable
PSA cell. immunopurifié par 5D3D11	17,1	51,8	79,9	153,1
PSA cell. immunopurifié par 6C8D8	Non détectable	Non détectable	Non détectable	7,0

L'activité enzymatique est exprimée en unités de fluorescence x 1000 / minute.

Ce tableau montre que le PSA immunopurifié par l'anticorps 5D3D11 possède une activité enzymatique détectable. Cette activité est augmentée en présence de NaCl 1,5 M. La capture du PSA par l'anticorps 8G8F5 augmente aussi l'activité enzymatique du PSA.

Le PSA immunopurifié par l'anticorps 6C8D8, quant à lui, n'a qu'une activité résiduelle détectable en présence de NaCl 1,5 M et de l'anticorps 8G8F5, montrant que cette forme de PSA immunopurifiée n'est pas activable.

Cet exemple met en évidence que, parmi les formes libres actives du PSA dans les

cellules LNCaP, on trouve la forme libre activable qui est détectable selon le procédé de l'invention.

Exemple 2 : Détection de la forme libre activable du PSA à partir de sérum de patients ayant un adénocarcinome de la prostate

Le pool de sérum utilisé est composé de 30 sérum de patients ayant un cancer de la prostate. Concentration de ce pool en PSA : PSA total : 71 ng/ml ; PSA libre : 12 ng/ml, déterminée à l'aide de l'appareil Vidas.

2.1. Immunopurification de sérum

On utilise la résine décrite dans le paragraphe 1.2 comme support solide ayant fixé les anticorps 5D3D11 et 6C8D8. 50 µl de ces résines sont mises en contact avec 1 ml du pool de sérum décrit ci-dessus pendant toute une nuit à 4°C sous agitation. Puis les tubes sont centrifugés, la fraction contenant le PSA non fixé a été conservée, la résine a été lavée 3 fois avec du PBS-Tween 0,5% (les fractions de lavages sont regroupées et conservées), puis le PSA fixé par les anticorps 5D3D11 ou 6C8D8 a été élué pendant 5 min avec 200 µl de Glycine 0,1 M PH 2,2 contenant 1 mg/ml de BSA, et neutralisé à pH 7,2 avec du Tris 2 M pH 8.

2.1. Mesure de l'activité enzymatique du PSA immunopurifié à partir de sérum

Les puits d'une plaque ELISA Nunc Maxisorp noire (compatible avec une détection en fluorescence) ont été coatés 2 heures à 37°C avec 100 µl d'une solution de streptavidine à 10 µg/ml en tampon carbonate pH 9,6 et bloqués pendant 2 heures à 37°C avec du TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.15 M) contenant 2 mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumine). Après 3 lavages des puits en TBS-Tween 0,05%, 100 µl d'anticorps anti-PSA total biotinylé dilué à 10 µg/ml en TBS-BSA ont été introduits. L'anticorps anti-PSA total peut être :

- soit l'anticorps 11E5C6, qui ne modifie pas l'activité enzymatique du PSA,
- soit l'anticorps 8G8F5 qui augmente l'activité enzymatique du PSA capté.

Après 2 heures d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés avec du TBS-Tween 0,05%, et 100 µl du PSA immunopurifié à partir de sérum par les anticorps 5D3D11 ou 6C8D8 ont été introduits et incubés toute la nuit à 4°C. Les puits ont ensuite été lavés à nouveau en TBS-Tween 0,05% et incubés 15 min avec du TBS-BSA 2 mg/ml dont la

concentration en NaCl a été montée à 1,5 M. Les puits ont ensuite été vidés et mis en contact avec 100 µl du substrat fluorescent Mu-KGISSQY-AFC (Enzyme System Products, filiale d'ICN) dilué à 400 µM en TBS-BSA contenant 1,5 M de NaCl. La cinétique enzymatique a été suivie à 37°C pendant 2 heures (excitation 390 nm, émission 510 nm ; 1 mesure / minute) avec le lecteur Fluoroskan (Thermolabs Systems). L'activité enzymatique du PSA correspond à la pente de la courbe obtenue.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 2 ci-après :

Tableau 2

	NaCl 1,5 M	
	11E5C6 biotinylé	8G8F5 biotinylé
Pool de sérum initial	1,0*	4,9*
PSA sérique immunopurifié par 5D3D11	29,5	62,9
PSA sérique immunopurifié par 6C8D8	4,4	11,5

L'activité enzymatique est exprimée en unités de fluorescence x 1000 / minute.

*L'activité mesurée directement à partir du sérum (sans immunopurification) est sous-estimée, car le PSA activé se complexe immédiatement avec l'ACT sérique.

Ce tableau montre que l'on est capable de mesurer une activité enzymatique sur du PSA immunopurifié à partir de sérum : le sérum contient donc du PSA libre activable.

On constate toujours bien une différence significative d'activité entre le PSA immunopurifié par l'anticorps 5D3D11 et celui immunopurifié par l'anticorps 6C8D8, montrant que l'anticorps 5D3D11 reconnaît spécifiquement le PSA libre activable.

Exemple 3 : Utilisation de l'anticorps 5D3D11 dans un test diagnostique pour la discrimination entre une BHP et l'adénocarcinome de la prostate

Pour le dosage, on a utilisé l'appareil Vidas, adapté pour inclure les réactifs de dosage appropriés, mais utilisé selon les instructions du fournisseur (bioMérieux, France).

3.1 Dosage du PSA activable dans des sérums de patients

L'anticorps 5D3D11 est utilisé comme anticorps de capture dans un test de type sandwich. Le PSA capté est détecté par l'anticorps anti-PSA total 5D5A5 couplé à la

phosphatase alcaline. Le protocole est tel que décrit précédemment.

La standardisation du test a été effectuée selon les recommandations du fournisseur en utilisant du PSA séminal immunopurifié par l'anticorps 5D3D11 et dosé en PSA total. La limite de détection du test est 0,05 ng/ml de PSA actif/ml. La courbe de standardisation dans le domaine de concentration de 0 à 1,5 ng/ml est représentée sur la figure 2. Cette courbe, qui est proche d'une droite, met en évidence que le dosage avec un partenaire de liaison reconnaissant l'épitope de séquence SEQ ID N°1 permet de détecter du PSA libre activable avec une bonne sensibilité.

3.2 Dosage du (PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) dans des sérums de patients

On a répété le mode opératoire décrit précédemment, à ceci près qu'on a utilisé l'anticorps anti-PSA libre 6C8D8 comme anticorps de capture pour la capture dans le sérum des formes de PSA libre inactif, ainsi que l'anticorps anti-PSA total 11E5C6 couplé à la phosphatase alcaline comme anticorps de détection, lequel reconnaît dans le cas présent les formes de PSA libre clivé et libre dénaturé.

3.3 Utilisation du rapport PSA activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) pour une meilleure discrimination entre un cancer de la prostate et une BPH

Une étude rétrospective a été effectuée avec 177 sérums de patients contenant du PSA. Ces sera correspondent à :

- 89 cancers de la prostate bien identifiés avec les taux de PSA totaux, les grades des tumeurs, les scores de Gleason et des informations éventuelles sur les traitements (radiothérapie, hormonothérapie, prostatectomie ou inconnu) effectués ultérieurement,
- 65 hyperplasies bénignes,
- 23 prostates normales (ayant des taux de PSA > à 2,5ng/ml mais des biopsies négatives).

Sur ces sérums, on a calculé le rapport PSA libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) obtenu à l'aide des dosages précédents et on a reproduit ces valeurs sur le graphe de la figure 3, partie A.

Ainsi que le montre la partie A de la figure 3, en utilisant un seuil de 0,66 pour des sérums ayant un taux de PSA total compris entre 2,5 et 10 ng/ml, le rapport PSA activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) permet de caractériser 22/33 cancers (67%),

19/19 prostates normales (100%) et 27/28 BPH (96%).

A titre de comparaison, on a calculé le rapport PSA libre sur PSA total à l'aide de deux kits Vidas (Kit PSA total et Kit PSA libre, bioMérieux, France) selon les recommandations du fournisseur. Les résultats sont reproduits sur la partie B du graphe de la figure 3. Cette partie B montre qu'il existe une zone d'incertitude pour des valeurs de 0,15 à 0,25.

3.4 Sensibilité du procédé de l'invention

3.4.1 Pour les sérums inclus dans les zones d'incertitude des procédés de l'art antérieur

Les valeurs des rapports PSA libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) obtenues selon le procédé de l'invention pour les 28 sérums de la zone d'incertitude obtenue avec le procédé de l'art antérieur ont été reproduites sur la figure 4.

Cette figure met en évidence que, pour les sérums dont le rapport PSA libre/PSA total est compris entre 0,15 et 0,25, sérums dans lesquels les procédés connus ne permettent pas de discriminer un cancer d'une BPH, le rapport PSA activable/(PSA libre clivé + PSA libre dénaturé) permet de caractériser 13/15 cancers (80%), 7/7 BPH (100%) et 6/6 prostates normales (100%).

3.4.2 Pour les sérums ayant un taux de PSA inférieur à 2,5ng/ml

On a sélectionné les 20 sérums de patients atteints de cancer (11) ou de BPH (9) ayant un taux de PSA inférieur à 2,5 ng/ml et on a reproduit les valeurs des rapports PSA libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) sur la figure 5.

Cette figure met en évidence que la discrimination entre un cancer de la prostate et une BPH en utilisant le rapport PSA activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) reste aussi valable pour des sérums ayant un taux de PSA inférieur à 2,5 ng/ml.

3.5 Modification de l'anticorps de détection

On a répété le mode opératoire ci-dessus avec 8 sérums, 5 sérums de patients atteints de cancer de la prostate et 3 sérums de patients atteints de BPH, à ceci près qu'on a utilisé l'anticorps 11E5C6 (Michel S., et al., 1999, *supra*) comme anticorps de détection.

Les résultats sont indiqués sur la figure 6 sur laquelle les valeurs des rapports PSA

libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) en utilisant l'anticorps 5D5A5 comme anticorps de détection du PSA activable sont reproduites dans la partie A de la courbe, et les valeurs des rapports PSA libre activable/(PSA libre dénaturé + PSA libre clivé) obtenues avec les mêmes sérums mais avec l'anticorps 11E5C6 comme anticorps de détection sont
5 reproduites dans la partie B.

Cette figure met en évidence qu'il existe bien une valeur-seuil quel que soit l'anticorps de détection utilisé et que la valeur-seuil dépend de l'anticorps utilisé en détection.

REVENDICATIONS

1. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

5 i) mettre en contact un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable avec un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate,

ii) mettre en évidence la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison,

10 iii) calculer le rapport entre la quantité de forme libre activable de PSA détectée dans l'étape ii) et la quantité d'une forme de PSA autre que la forme libre activable, présente dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet, et

15 iv) déterminer si les patients sont affectés par un adénocarcinome de la prostate ou par une pathologie bénigne de la prostate en comparant la valeur du rapport déterminé dans l'étape iii) à une valeur-seuil prédéterminée, choisie selon le type de rapport utilisé et représentative de la limite de détection de chaque pathologie.

2. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1.

20

3. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) est un anticorps ou un fragment d'anticorps.

25

4. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la mise en évidence de la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison est mise en œuvre par détection indirecte par l'intermédiaire d'un partenaire de

REVENDEICATIONS

1. Procédé de diagnostic *in vitro* d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- 5 i) mettre en contact un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable avec un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate,
- ii) mettre en évidence la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison,
- 10 iii) calculer le rapport entre la quantité de forme libre activable de PSA détectée dans l'étape ii) et la quantité d'une forme de PSA autre que la forme libre activable, présente dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet, et
- iv) déterminer si les patients sont affectés par un adénocarcinome de la prostate ou par une pathologie bénigne de la prostate en comparant la valeur du rapport déterminé dans l'étape iii) à une valeur-seuil prédéterminée, choisie selon le type de rapport utilisé et représentative de la
- 15 limite de détection de chaque pathologie.

2. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1.

20

3. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison utilisé dans l'étape i) est un anticorps ou un fragment d'anticorps.

25

4. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la mise en évidence de la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison est mise en œuvre par détection indirecte par l'intermédiaire d'un partenaire de détection, de préférence par l'utilisation d'un anticorps anti-PSA total.

détection, de préférence par l'utilisation d'un anticorps anti-PSA total.

5. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la mise en évidence de la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison est mise en œuvre par détermination de l'activité enzymatique de la forme libre activable du PSA immunopurifiée et activée.

6. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la forme de PSA autre que la forme libre activable utilisée pour calculer le rapport est la forme libre inactive du PSA ou les formes libres clivées et dénaturées du PSA.

7. Utilisation de la détection de la forme libre activable du PSA pour le diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate.

8. Kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate ou une pathologie bénigne de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable et
- des moyens pour doser les formes de PSA autres que la forme libre activable.

9. Kit de diagnostic selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps.

10. Kit de diagnostic selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdits moyens sont des anticorps ou fragments d'anticorps.

11. Conjugué constitué d'un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement

5. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la mise en évidence de la capture de la forme libre activable du PSA par ledit partenaire de liaison est mise en œuvre par détermination de l'activité enzymatique de la forme libre activable du PSA immunopurifiée et activée.

6. Procédé de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la forme de PSA autre que la forme libre activable utilisée pour calculer le rapport est la forme libre inactive du PSA ou les formes libres clivées et dénaturées du PSA.

7. Utilisation de la détection de la forme libre activable du PSA pour le diagnostic *in vitro* d'une pathologie bénigne de la prostate ou d'un adénocarcinome de la prostate.

8. Kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate ou une pathologie bénigne de la prostate, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement au PSA libre activable et
- des moyens pour doser les formes de PSA autres que la forme libre activable.

9. Kit de diagnostic selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1, de préférence un anticorps ou un fragment d'anticorps.

10. Kit de diagnostic selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdits moyens sont des anticorps ou fragments d'anticorps.

11. Conjugué constitué d'un partenaire de liaison capable de se lier spécifiquement

au PSA libre activable et de la forme libre activable du PSA.

12. Conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit partenaire de liaison est capable de reconnaître l'épitope de séquence SEQ ID N°1.

5

13. Conjugué selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que la forme libre activable du PSA est activée.

1/4

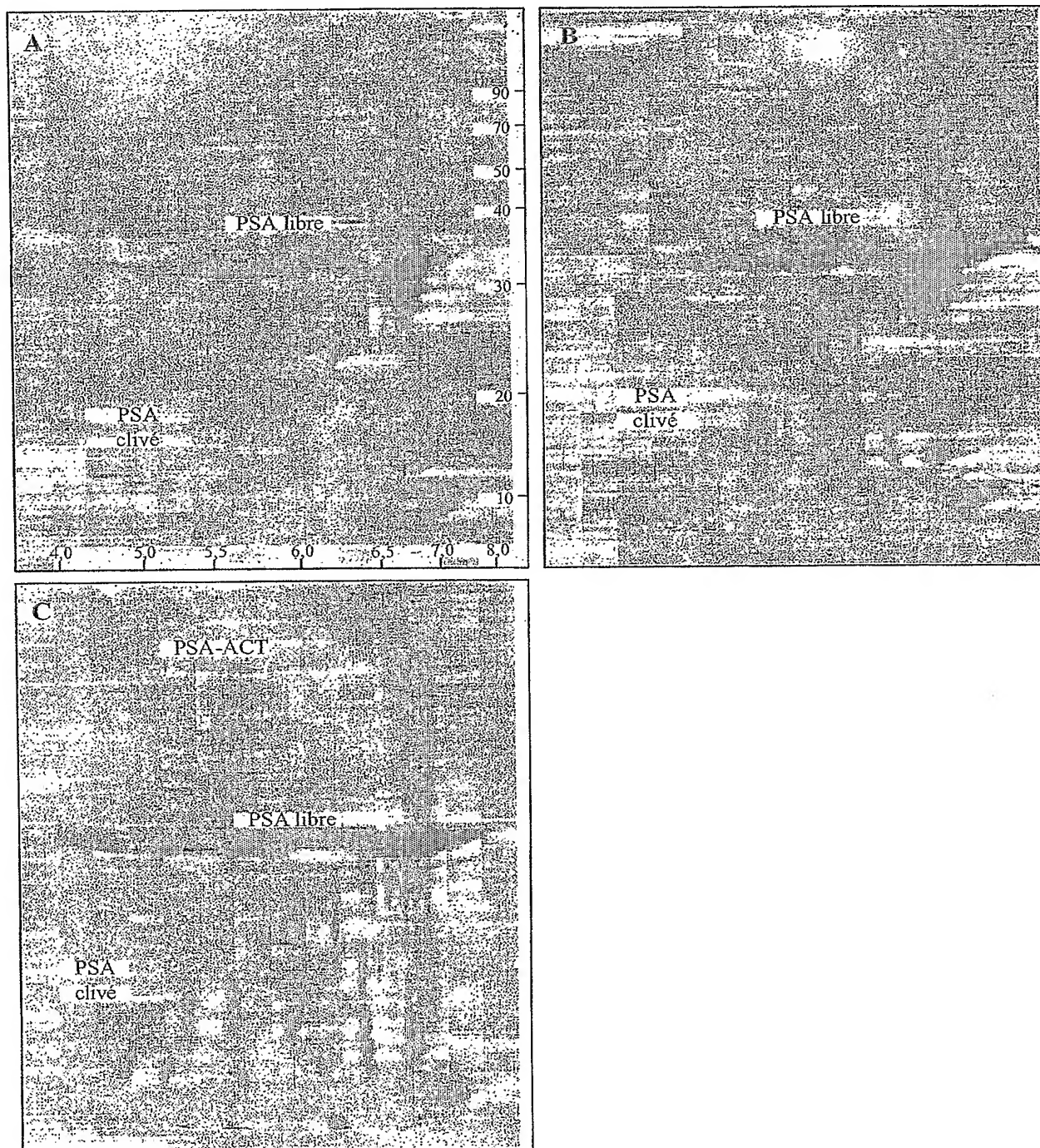


Figure 1

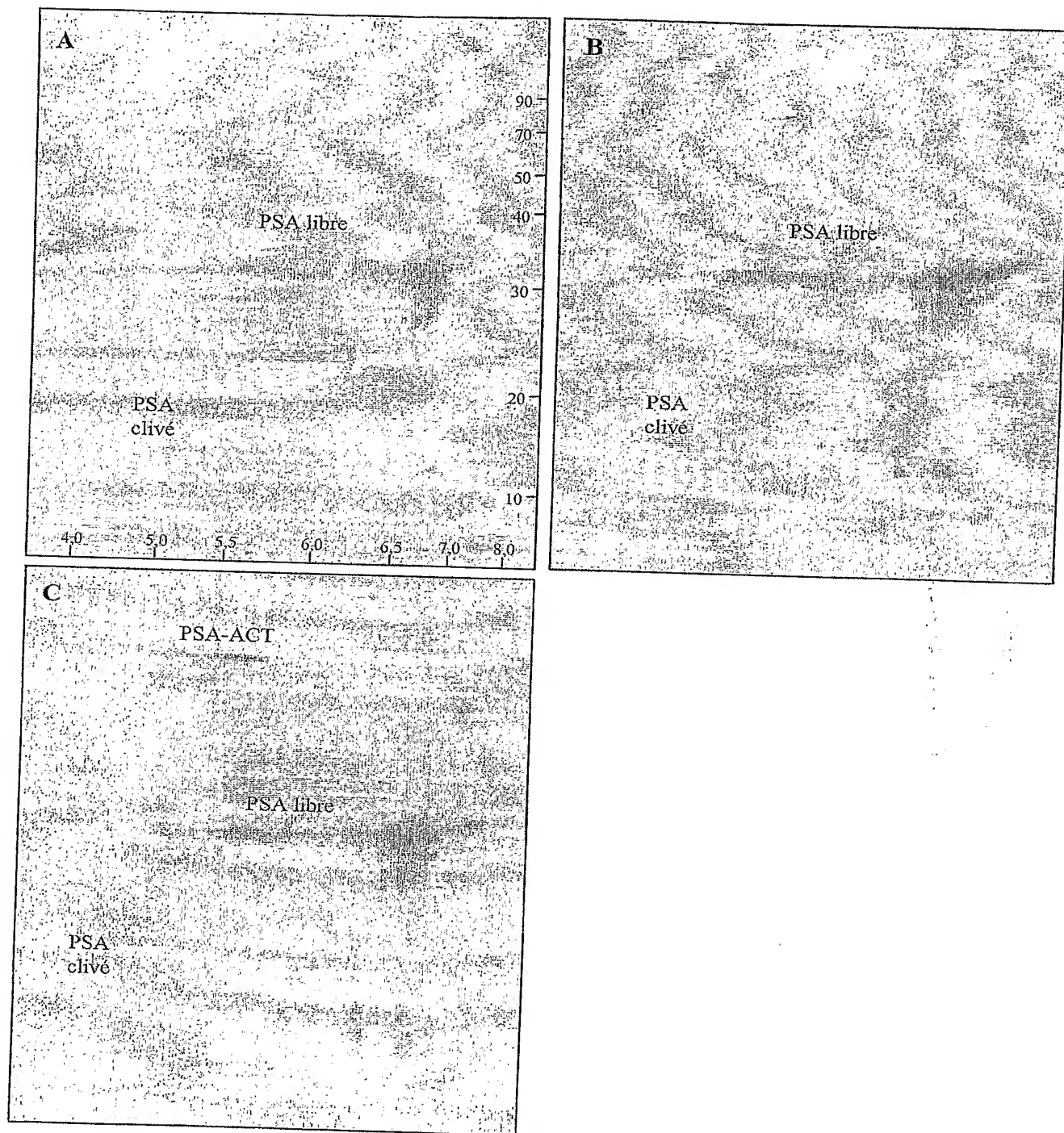


Figure 1

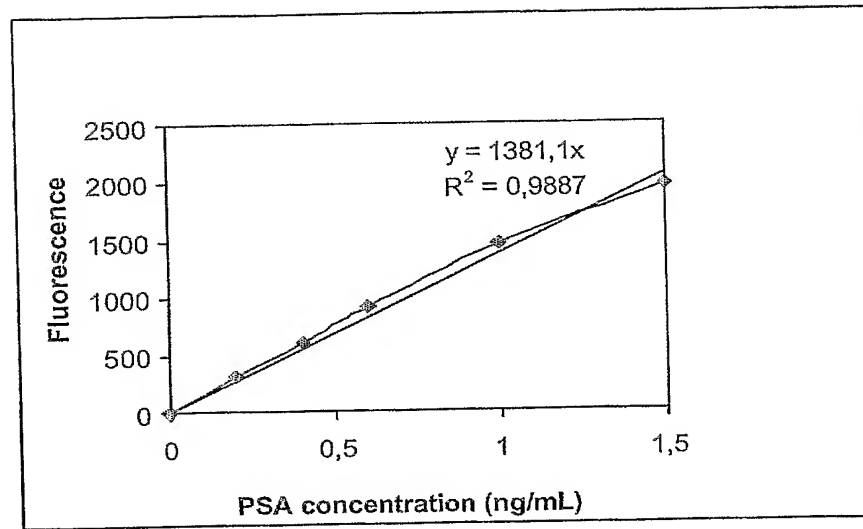


Figure 2

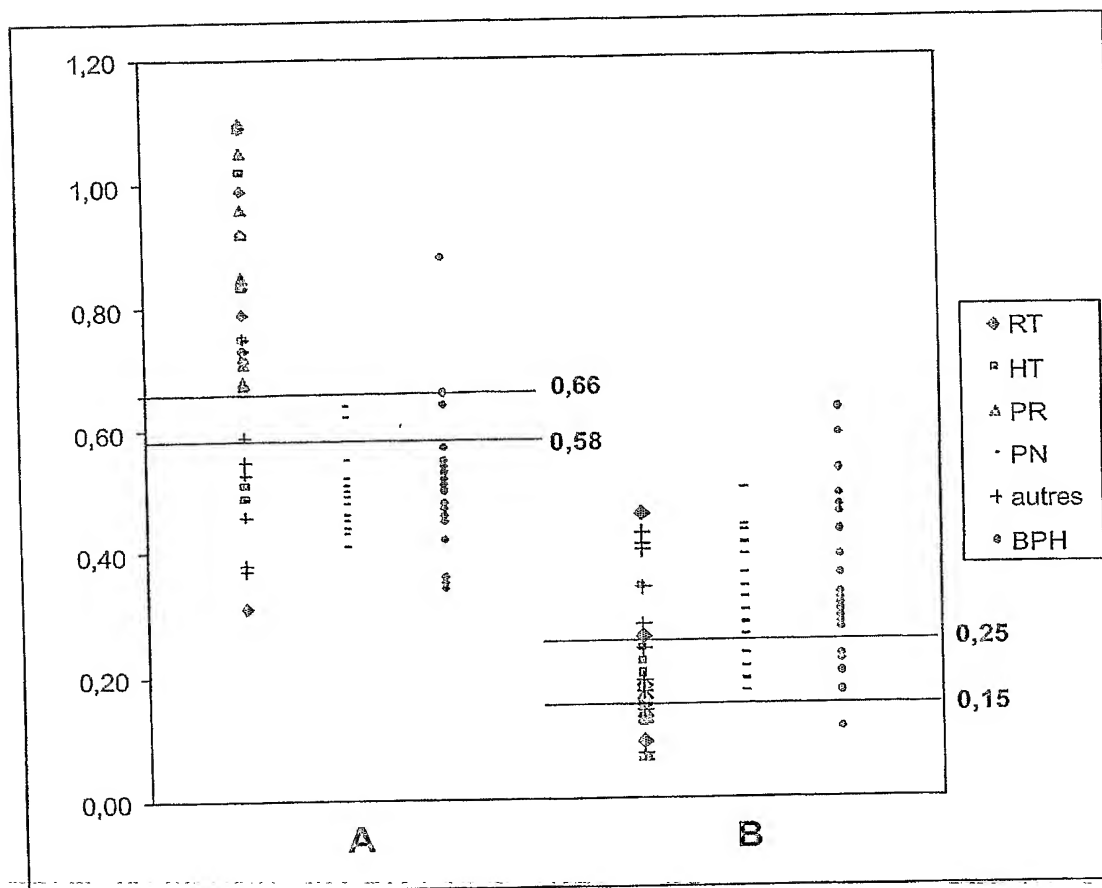


Figure 3

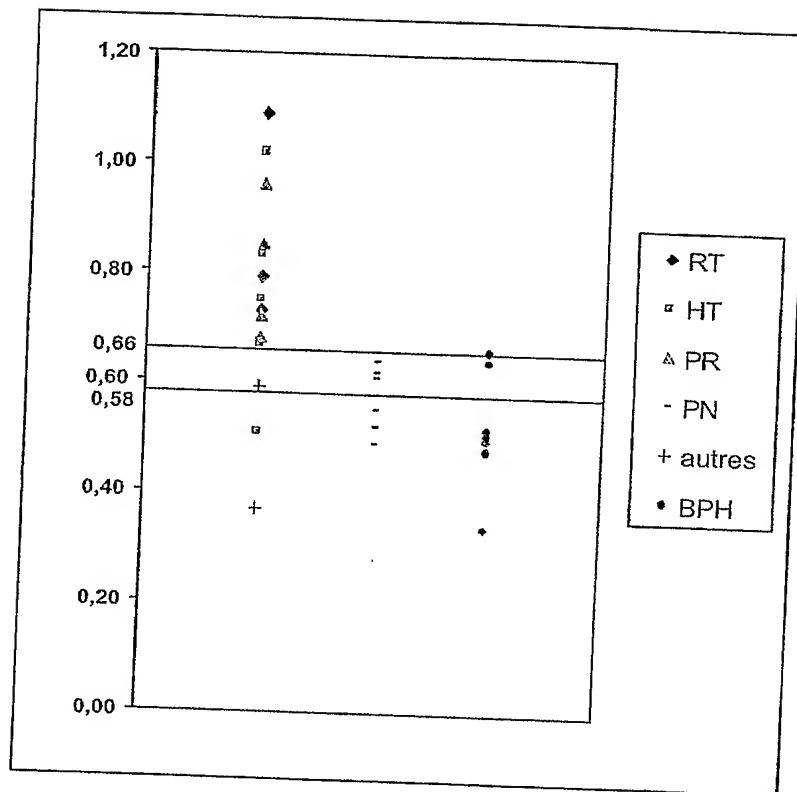


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux

<120> Procédé de détection de la forme libre activable du PSA et son utilisation pour le diagnostic des pathologies bénignes de la prostate et de l'adénocarcinome de la prostate

<130> PSA Activable

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> épitope

<400> 1

Asp	Thr	Pro	Tyr	Pro	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Asp
1				5				10						15

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITE****Désignation de l'inventeur**

Vos références pour ce dossier	PSA ACTIVABLE
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	Procédé de détection de la forme libre activable du PSA et son utilisation pour le diagnostic des pathologies bénignes de la prostate et de l'adénocarcinome de la prostate
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	BUSSERET-MICHEL
Prénoms	Sandrine
Rue	16 rue Pierre Blanc
Code postal et ville	69001 LYON
Société d'appartenance	bioMérieux
Inventeur 2	
Nom	JOLIVET-REYNAUD
Prénoms	Colette
Rue	29 route Nationale
Code postal et ville	69720 ST BONNET DE MURE
Société d'appartenance	bioMérieux

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, BIOMERIEUX, V.Bitaud

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

FR 05 50132

